

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



552557

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. Oktober 2004 (21.10.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/090604 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G02B 21/08

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/003156

(22) Internationales Anmeldedatum:
25. März 2004 (25.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 17 615.2 11. April 2003 (11.04.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): CARL ZEISS JENA GMBH [DE/DE]; Carl-Zeiss-
Promenade 10, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WESTPHAL, Peter
[DE/DE]; Kritzegegraben 6, 07743 Jena (DE). KÜHNER,
Martin [DE/DE]; Büttelbaum 72, 07639 Bad Klosterlaus-
nitz (DE). NEUMANN, Tobias [DE/DE]; Johannisstrasse
24, 07743 Jena (DE).

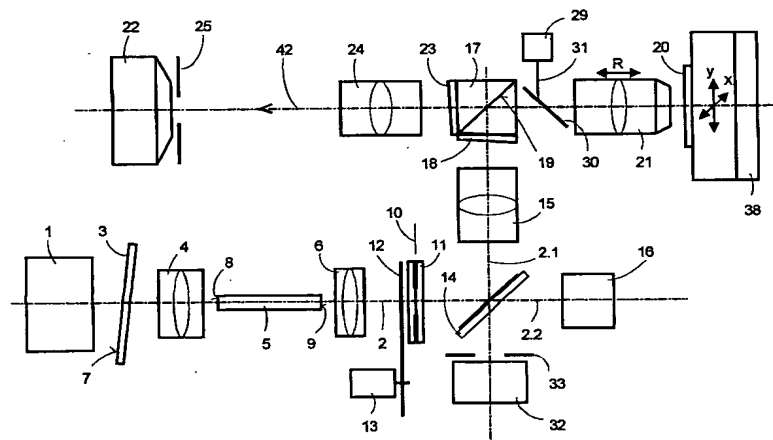
(74) Anwalt: NIESTROY, Manfred; Geyer, Fehners & Part-
ner (G.b.R.), Sellierstrasse 1, 07745 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROSCOPE ARRANGEMENT

(54) Bezeichnung: MIKROSKOPANORDNUNG



(57) Abstract: The invention relates to a microscope arrangement which comprises an illumination source (1), optical components for generating an illumination beam path, an objective (21) through which the illumination beam path is directed onto a sample (20) which is present in the object plane of the objective (21) or in the proximity thereof, and optical components for generating an imaging beam path directed onto the receiving surface of a camera (22). According to the invention, the microscope arrangement of the aforementioned type is provided with a homogenizing unit (5) for homogenizing the illumination light that is incident on the sample section to be examined. Said homogenizing unit (5) makes it possible to illuminate the object plane of the microscope arrangement and thus the subsection of a sample (20) present in the object plane or in the proximity thereof in a homogeneous manner, thereby improving the quality of reproduction of said sample section and resulting in a higher measuring accuracy and thus in a higher reproducibility.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf eine Mikroskopanordnung, umfassend eine Beleuchtungsquelle (1), optische Baugruppen zur Erzeugung eines Beleuchtungsstrahlengangs, ein Objektiv (21), durch das der Beleuchtungsstrahlengang auf eine Probe (20) gerichtet ist, die sich in der Objektebene des Objektivs (21) oder in

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/090604 A2



KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

deren Nähe befindet, sowie optische Baugruppen zur Erzeugung eines auf die Empfangsfläche einer Kamera (22) gerichteten Abbildungsstrahlengangs. Erfindungsgemäss ist bei einer solchen Mikroskopianordnung eine Homogenisierungseinrichtung (5) zur Vergleichsmässigung der Intensität des Beleuchtungslichts vorhanden, das auf den zu untersuchenden Probenabschnitt trifft. Mit der Homogenisierungseinrichtung (5) wird vorteilhaft erreicht, dass die Objektebene der Mikroskopianordnung und damit der sich in der Objektebene oder in deren Nähe befindende Teilabschnitt einer Probe (20) homogen ausgeleuchtet wird und dadurch eine verbesserte Qualität der Abbildung dieses Probenabschnitts erzielt wird, was eine höhere Messgenauigkeit und im Ergebnis dessen eine höhere Reproduzierbarkeit zur Folge hat.

5

10 Titel
Mikroskopanordnung

Gebiet der Erfindung

15 Die Erfindung bezieht sich auf eine Mikroskopanordnung, umfassend eine Beleuchtungsquelle, optische Baugruppen zur Erzeugung eines Beleuchtungsstrahlengangs, ein Objektiv, durch das der Beleuchtungsstrahlengang auf eine Probe gerichtet ist, die sich in der Objektebene des Objektivs oder in deren Nähe befindet, sowie optische Baugruppen zur Erzeugung eines auf die Empfangsfläche einer Kamera gerichteten
20 Abbildungsstrahlengangs.

Stand der Technik

25 Mikroskopanordnungen, insbesondere zur Auflichtmikroskopie im Zusammenhang mit radiometrischen Messungen an der Oberfläche von Biochips, sind an sich bereits bekannt. Derartigen Anordnungen liegen im wesentlichen zwei unterschiedliche Funktionsprinzipien zugrunde.

30 So sind beispielsweise Laserscanningmikroskope bekannt, bei denen lediglich eine kleine Fläche von einigen μm^2 der Probe beleuchtet wird und demzufolge im Augenblick der Beleuchtung auch nur dieselbe kleine Fläche auswertbar ist. Um bei der Auswertung Falschlicht zu unterdrücken und die Abbildungsgüte zu erhöhen, werden „konfokale“ Scanverfahren angewendet, indem in den Mikroskopstrahlengang Lochblenden gestellt werden.

35

Nachteil der Laserscanningmikroskopie insbesondere bei Biochip-Untersuchungen ist die Gefahr des Ausbleichens aufgrund der hohen Intensität der auf die kleine betrachtete Fläche fokussierten Laserstrahlung. Außerdem ist die Wahl der Wellenlänge des Beleuchtungslichts stark eingeschränkt. Weiterhin erfordern Laserscanner mechanisch bewegte Baugruppen, wie beispielsweise galvanische Scaneinrichtungen, was einen verhältnismäßig hohen mechanischen Verschleiß und auch hohen Justageaufwand zur Folge hat. Nachteilig ist auch die geringe Quanteneffizienz des Detektors, der in der Regel als Fotomultiplier ausgebildet ist, wovon insbesondere Beleuchtungslicht mit Wellenlängen oberhalb von 600 nm betroffen ist.

Ein weiteres Prinzip beruht auf der Weitfeld-Detektion. Dabei wird ein großflächigeres Feld auf der Probe ausgeleuchtet, und mittels eines Objektivs und gegebenenfalls weiterer Optiken wird ein entsprechender Abschnitt der Probe auf einen ortsauflösenden Empfänger, beispielsweise eine CCD-Kamera, abgebildet.

Sofern es sich dabei um fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen handelt, sind in den Beleuchtungs- bzw. Anregungsstrahlengang und in den Detektions- bzw. Fluoreszenzstrahlengang Spektralfilter gestellt, die für Licht der jeweiligen Wellenlänge durchlässig sind.

Nachteiligerweise ist die Qualität von Bild zu Bild innerhalb einer Bildfolge, die mit einer der bisher bekannten, mit einer Kamera arbeitenden Mikroskopanordnungen von einer Probenoberfläche aufgenommen wird, nicht ausreichend gleichmäßig, so daß sich beim Aneinanderfügen mehrerer Kamerabilder eine kachelartige Struktur im Gesamtbild ergibt. Insbesondere beim Auslesen von Biochips ist dieses Aneinanderfügen von Bildern jedoch unerlässlich, und die kachelartige Struktur ist im Hinblick auf eine genaue Auswertung unbedingt zu vermeiden.

Weiterhin ist nachteilig, daß die Gleichmäßigkeit der Ausleuchtung des Objektfeldes bzw. des abzubildenden Probenabschnittes für hochgenaue Untersuchungen nicht ausreicht und außerdem die begrenzte Lebensdauer der Beleuchtungsquellen bzw. deren Wartung und wiederholt notwendige Justage eine kontinuierliche Bewertung wechselnder Proben, wie dies beispielsweise bei Messungen von Biochips mit hohem Durchsatz erforderlich ist, behindert.

Eine weitere Störquelle sind unerwünschte Reflexe im Beleuchtungs- und Abbildungsstrahlengang.

5 **Beschreibung der Erfindung**

Davon ausgehend liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine Mikroskopanordnung, die nach dem Prinzip der Weitfeld-Detektion arbeitet, dahingehend weiterzubilden, daß Meßergebnisse mit höherer Genauigkeit erzielt werden, als dies im bisherigen Stand der Technik möglich ist.

10

Erfindungsgemäß ist bei einer solchen Mikroskopanordnung eine Homogenisierungseinrichtung zur Vergleichmäßigung der Intensität des Beleuchtungslichts, das auf den zu untersuchenden Probenabschnitt trifft, vorhanden.

15

Mit der Homogenisierungseinrichtung wird vorteilhaft erreicht, daß die Objektebene der Mikroskopanordnung und damit der sich in der Objektebene oder in deren Nähe befindende Teilabschnitt einer Probe homogen ausgeleuchtet und dadurch eine verbesserte Qualität der Abbildung dieses Probenabschnitts erzielt wird, wodurch im Ergebnis schließlich eine höhere quantitative Meßgenauigkeit zu bestimmender Intensitätswerte erzielt wird.

20

Als Beleuchtungsquellen kommen Halogenlampen, Bogenlampen, LED's und Laser in Betracht, die Licht im sichtbaren, im UV- und/oder im IR-Spektralbereich emittieren.

25

Die Homogenisierungseinrichtung ist vorteilhaft als Lichtleiter ausgebildet, welcher eine der Beleuchtungsquelle zugewandte Einstrahlfläche und eine dem Objektiv zugewandte Abstrahlfläche für das Beleuchtungslicht aufweist. Dabei kann der Lichtleiter als innen verspiegelter Hohlstab, als innen total-reflektierender, transparenter Vollstab, als Flüssigkeitslichtleiter oder auch in Form eines Glasfaserbündels ausgeführt sein.

30

Besteht der Lichtleiter aus einem Glasfaserbündel, so ist es empfehlenswert, die Abstrahlfläche selbst als Lichtstreuicheibe auszugestalten oder der Abstrahlfläche eine Lichtstreuicheibe nachzuordnen, die Lichtstreuicheibe unscharf in die Objektebene abzubilden und dadurch die Ausleuchtung zu homogenisieren.

35

Der optisch wirksame Querschnitt des Lichtleiters kann entweder kreisrund, quadratisch oder rechteckig ausgeführt sein. Weiterhin kann der Lichtleiter so ausgestaltet sein, daß die Einstrahlfläche, die Abstrahlfläche oder auch beide dieser Flächen mit einer Mikrolinsenstruktur versehen sind, wobei eine Vielzahl runder, quadratischer, wabenförmiger oder zylinderförmiger Mikrolinsen auf der jeweiligen Fläche nebeneinander angeordnet sind und jede dieser Linsen einen Linsenradius von etwa 100 µm bis 1000 µm senkrecht zur optischen Achse des Beleuchtungsstrahlengangs hat.

Die Homogenisierung der Strahlungsintensität erfolgt, indem das Licht innerhalb des Lichtleiters durch Reflexion fortgeleitet wird und dabei aufgrund der Vielfachreflexionen einzelner Strahlungsanteile an der innen hochreflektierenden Wandung eine Durchmischung erfährt. Dadurch wird über den Lichtweg im Lichtleiter hinweg eine Vergleichmäßigung der Strahlungsintensität, auf den Strahlquerschnitt bezogen, erzielt.

Wird zusätzlich noch die Ein- und/oder die Abstrahlfläche mit einer Mikrolinsenstruktur versehen, wird das Beleuchtungslicht beim Durchgang durch diese Struktur in eine der Vielzahl der Mikrolinsen entsprechende Anzahl von Teilstrahlen aufgespaltet, wodurch eine noch bessere Durchmischung bzw. Homogenisierung der Intensitätsverteilung erzielt wird.

Dabei muß die Mikrostruktur nicht, wie beispielhaft dargestellt, auf der Ein- und/oder Abstrahlfläche vorhanden sein, sondern es ist denkbar und führt zu vergleichbar guten Ergebnissen, wenn die Mikrolinsenstruktur auf gesonderten optischen Bauelementen vorhanden ist und diese der Einstrahlfläche vorgeordnet und/oder der Abstrahlfläche nachgeordnet sind.

Im Rahmen der Erfindung liegt es auch, die Homogenisierung durch gekreuzte Mikrozyylinderlinsen zu erzielen, wobei zwei im Beleuchtungsstrahlengang aufeinander folgende optische Bauelemente mit Mikrozyylinderlinsen strukturiert sind, deren Längsrichtungen senkrecht zur optischen Achse des Beleuchtungsstrahlengangs orientiert sind, wobei jedoch die Längsrichtung der Mikrozyylinderlinsen auf dem einen Bauelement mit der Längsrichtung der Mikrozyylinderlinsen auf dem anderen Bauelement einen Winkel von 90° einschließt.

Um die homogenisierte Beleuchtungsstrahlung für die Abbildung der Probe nutzbar zu machen, sind Mittel zur Abbildung der Abstrahlfläche der Homogenisierungseinrichtung in die Feldblendenebene der Mikroskopanordnung vorgesehen sowie Mittel zur Abbildung der Feldblendenebene in die Objektebene. Damit wird erreicht, daß das an
5 der Abstrahlfläche homogenisiert austretende Beleuchtungslicht mit vergleichmäßiger Intensitätsverteilung in die Objektebene gelangt.

In einer vereinfachten Ausführung wird die Abstrahlfläche der Homogenisierungseinrichtung nicht in die Feldblendenebene abgebildet, sondern direkt in der Feldblendenebene bzw. in deren unmittelbarer Nähe positioniert. Hierdurch ist eine Reduzierung
10 der Anzahl an optischen Baugruppen möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, daß die optisch wirksame Fläche einer in der Feldblendenebene angeordneten Feldblende streifenartig oder schachbrettartig strukturiert ist, wobei in der Struktur transparente und
15 intransparente Teilflächen alternieren. In diesem Fall ist unmittelbar vor der Feldblende ein Shutter zur teilweisen Abblockung des Lichts angeordnet. Der Shutter ist vorzugsweise ansteuerbar und dient zur Verdunklung auswählbarer Flächenbereiche der Feldblende. Damit wird insbesondere erreicht, daß ein gegebenenfalls vorhandener Autofokussensor nicht von gestreutem Anregungslicht überstrahlt wird.
20

Eine so strukturierte Feldblende wird beispielsweise erzeugt, indem die gewünschte streifen- oder schachbrettartige Struktur zunächst als Metallschicht auf eine Glasplatte aufgedampft und dann eine zweite Glasplatte auf diese Struktur aufklebt wird. Die beiden nach außen, zur Luft hin hinggerichteten Grenzflächen der Glasplatten werden vorzugsweise entspiegelt.
25

In einer ebenfalls bevorzugten Ausführung der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung ist der Feldblende im Beleuchtungsstrahlengang ein erster teildurchlässiger Umlenkspiegel nachgeordnet, von dem der überwiegende Teil des Beleuchtungslichts durch einen den Beleuchtungsstrahlengang parallelisierenden Beleuchtungstubus hindurch und nachfolgend je nach Anwendungsfall noch durch ein Spektralfilter zur Auswahl eines zur Anregung vorgesehenen Spektralanteils auf einen Farbteiler, beispielsweise einen dichroitischen Spiegel, oder einen teildurchlässigen Spiegel trifft und von
30 dessen Teilerfläche durch das Objektiv hindurch auf die Probe gelenkt wird.
35

Ein an dem vor dem Beleuchtungstubus angeordneten teiltransparenten Umlenkspiegel abgezwiegt der geringere Teil des Beleuchtungsstrahlengangs kann beispielsweise auf einen Monitordetektor gerichtet sein, der zur Kontrolle der Intensität des Beleuchtungslichts dient. Das Ausgangssignal des Monitordetektors kann dann zur Nachregelung oder Normierung der Intensität genutzt werden.

Von der Probe tritt das reflektierte oder, im Falle der Fluoreszenzmikroskopie emittierte Licht wieder durch das Objektiv, passiert den Farbteiler bzw. den teildurchlässigen Spiegel sowie ein nachgeordnetes zweites Spektralfilter, das für das Emissions- bzw. Reflexionslicht durchlässig ist, und gelangt anschließend durch einen Abbildungstubus hindurch zu der Kamera.

Vorteilhaft sind der Beleuchtungstubus und der Abbildungstubus aus identischen optischen Baugruppen ausgeführt, wodurch die Herstellungskosten gering gehalten werden können. Außerdem ist es so möglich, die Mikroskopanordnung mit einer definierten optischen Schnittstelle zur Kopplung des Objektivs sowohl mit dem Beleuchtungstubus als auch mit dem Abbildungstubus zu versehen. Dies hat den Vorteil, daß verschiedene Objektive in einfacher Weise bei geringem Justageaufwand gegeneinander ausgetauscht und je nach Wahl Objektive genutzt werden können; die entweder eine hohe optische Auflösung von kleiner 1 µm ermöglichen oder ein großes Objektfeld mit bis zu einigen Zentimetern Durchmesser ausleuchten.

Zu diesem Zweck sind mindestens zwei Objektive, die sich bezüglich ihrer optischen Eigenschaften unterscheiden, auf einer Wechseleinrichtung, bevorzugt einem Objektivrevolver, angeordnet.

Außerdem ist vorgesehen, daß dem Objektiv bzw. den Objektiven jeweils ein abnehmbares Ausgleichsglas vorgeordnet ist, wodurch wahlweise mit Ausgleichsglas auf einer dem Objektiv zugewandten Luft/Festkörper-Grenzfläche an der Probe oder, ohne Ausgleichsglas, durch einen transparenten Probenträger hindurch gemessen werden kann.

Weiterhin ist vorteilhaft vorgesehen, daß die Flächennormalen der Spektralfilter im Beleuchtungs- und/oder im Abbildungsstrahlengang mit der optischen Achse des jeweiligen Strahlengangs einen Winkel im Bereich von 1° bis 20°, bevorzugt von 5°, einschließen. Diese Neigung gegen die jeweilige optische Achse verhindert, daß Falschlicht zur Auswertung gelangt, wobei insbesondere die Neigung des Spektralfilters im Beleuch-

tungsstrahlengang im Hinblick auf eine Autofokussiereinrichtung von Bedeutung ist, wie weiter unten noch näher erläutert wird.

Vorteilhaft ist vorgesehen, daß das Spektralfilter im Beleuchtungsstrahlengang und das
5 Spektralfilter im Abbildungsstrahlengang gemeinsam mit dem Farbteiler als Filterwürfel ausgebildet sind. Dieser Filterwürfel kann in ergänzender Ausgestaltung mit mindestens einem weiteren Filterwürfel, der sich vom ersten Filterwürfel hinsichtlich der gefilterten Wellenlängen, bei der Fluoreszenzmikroskopie zum Beispiel hinsichtlich der Anregungs- und Emissionswellenlängen unterscheidet, auf einer Wechseleinrichtung
10 angeordnet sein, die beispielsweise als Wechselrad ausgebildet ist.

Im Rahmen der Erfindung liegt es weiterhin, daß in den Beleuchtungsstrahlengang ein gegen die optische Achse des Beleuchtungsstrahlengangs geneigtes Graufilter einschwenkbar ist, wobei die Flächennormale des Graufilters mit der optischen Achse des
15 Beleuchtungsstrahlengangs einen Winkel im Bereich von 5° bis 15° einschließt. Dieses Graufilter dient zur Abschwächung der Strahlung, wobei die Neigung des Filters gegen die optische Achse verhindert, daß von der Eintrittsfläche des Graufilters zuviel Beleuchtungslicht zur Beleuchtungsquelle zurückreflektiert und dadurch eine unzulässige Aufheizung die Beleuchtungsquelle vermieden wird.

20 Als besonders vorteilhaft ist eine Ausgestaltung zu bewerten, bei der die Beleuchtungsquelle über eine lösbare mechanische Verbindung mit den übrigen Baugruppen der Mikroskopanordnung gekoppelt ist. Da die Beleuchtungsquelle aufgrund der Homogenisierungseinrichtung von den übrigen optischen Baugruppen, die der Erzeugung
25 des Beleuchtungsstrahlengangs dienen, entkoppelt ist und die mit der Homogenisierungseinrichtung erreichte gleichmäßige Intensitätsverteilung im Beleuchtungsstrahlengang auch dann erhalten bleibt, wenn die Beleuchtungsquelle gewechselt wird, ist die technische Grundlage für die justagefreie Auswechslung verschiedener Beleuchtungsquellen gegeneinander gegeben.

30 Dabei können sich die ausgewechselten Beleuchtungsquellen sowohl hinsichtlich der technischen Ausstattung (Halogenlampe, Bogenlampe, LED usw.) als auch hinsichtlich der Wellenlängen des abgestrahlten Lichts (VIS, UV, IR) unterscheiden.

35 Weiterhin besteht eine Ausführungsoption darin, das Objektiv auf einer Geradföhrung in Richtung seiner optischen Achse verschiebbar anzuordnen und zu diesem Zweck mit

einer motorisch angetriebenen Stelleinrichtung zu koppeln. Die Verschiebbarkeit des Objektivs in Richtung der optischen Achse ist zur Veränderung des Abstandes zwischen der Probe und dem Objektiv und damit zur Fokussierung nutzbar.

- 5 So ist optional eine Autofokussiereinrichtung vorgesehen, die einen Autofokussensor, eine Autofokusaktorik sowie Mittel zur Einkopplung eines Autofokus-Laser-strahls in den Beleuchtungsstrahlengang umfaßt.

Die Kamera kann wahlweise als CCD- oder als CMOS-Kamera ausgebildet sein.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführung der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung ist die optische Achse des Objektivs senkrecht zur Schwerkraftrichtung ausgerichtet. Dadurch können sich Luftblasen, die sich häufig an Glas/Flüssigkeits-Grenzflächen kartuschenartiger Proben absetzen, oberhalb des Flüssigkeitspegels sammeln. Sie verfälschen dann nicht mehr die Abbildung, wodurch die Meßgenauigkeit

15 weiterhin erhöht wird.

15

Zur Aufnahme der Probe ist ein in den Koordinatenrichtungen X und/oder Y senkrecht zur optischen Achse des Objektivs verstellbarer Probentisch vorgesehen. Der Probentisch kann vorteilhaft mit einem Piezoantrieb und/oder mit einem Spindelantrieb gekoppelt sein. Bevorzugt ist zur Verstellung des Probentisches in der Koordinatenrichtung X der Piezoantrieb und zur Verstellung des Probentisches in der Koordinatenrichtung Y, die bevorzugt der Schwerkraftrichtung entspricht, der Spindelantrieb vorgesehen.

20

25

Außerdem kann der Probentisch mit einer Nivelliereinrichtung gekoppelt sein, die zur Einstellung der Neigung der Probenoberfläche relativ zur optischen Achse des Objektivs dient. Die Probe ist mittels eines Probenhalters auf dem Probentisch angeordnet, wobei der Probenhalter und der Probentisch lösbar miteinander verbunden sind.

30

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. In den zugehörigen Zeichnungen zeigen:

35

- Fig.1 das Grundprinzip der Erfindung anhand einer Mikroskopanordnung für die Fluoreszenzmikroskopie, wobei die Homogenisierungseinrichtung als Vollglasstab ausgebildet ist,
- Fig.2 das Grundprinzip der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung, bei dem die Homogenisierungseinrichtung flexibel als Glasfaserbündel ausgebildet ist,
- Fig.3 das Grundprinzip der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung, bei dem die Homogenisierungseinrichtung aus zwei optischen Elementen besteht,
- Fig.4 eine in die erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung integrierte Autofokussiereinrichtung,
- Fig.5 das Prinzip der Autofokusaktorik innerhalb der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung,
- Fig.6 eine besonders im Hinblick auf die Autofokussierung vorteilhafte Ausgestaltungsvariante der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung,
- Fig.7 die Neigung der Flächennormalen eines Spektralfilters gegen die optische Achse des Abbildungsstrahlengangs,
- Fig.8 die Kopplung des Probenstisches der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung an eine Antriebseinrichtung,
- Fig.8a die Antriebseinrichtung für den Probenstisch, der in den Koordinatenrichtungen X und Y senkrecht zur optischen Achse des Objektivs verstellbar ist, wobei die optische Achse des Objektivs senkrecht zur Schwerkraftrichtung ausgerichtet ist,
- Fig.8b einen Blick in Richtung A aus Fig.8a auf die Probe,
- Fig.9 die Ausrichtung einer kartuschenartigen Probe, die ein Reservoir für eine Flüssigkeit aufweist, in der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung.

30 Ausführliche Beschreibung der Zeichnungen

In Fig.1 ist das Grundprinzip der Erfindung anhand einer Mikroskopanordnung für die Fluoreszenzmikroskopie dargestellt.

Dabei ist eine Beleuchtungsquelle 1 vorgesehen, die beispielsweise Licht im sichtbaren, im UV- und/oder im IR- Spektralbereich emittiert. In besonderen Ausführungen kann

die Beleuchtungsquelle 1 mehrere gesondert ansteuerbare Strahlungsquellen umfassen, die Licht in verschiedenen Wellenlängenbereichen emittieren.

5 Zur Formung eines Beleuchtungsstrahlengangs entlang der optischen Achse 2 sind der Beleuchtungsquelle 1 ein Graufilter 3, eine erste optische Baugruppe 4, eine Homogenisierungseinrichtung 5 und eine zweite optische Baugruppe 6 nachgeordnet.

10 Wie zeichnerisch angedeutet, schließt die Normale auf die Lichteintrittsfläche 7 des Graufilters mit der optischen Achse 2 des Beleuchtungsstrahlengangs einen Winkel im Bereich von 5° bis 15°, bevorzugt von 5° ein, so daß der von der Lichteintrittsfläche 7 reflektierte Anteil des Beleuchtungslichts nicht oder nur in einem geringen Maße in sich bzw. zur Beleuchtungsquelle 1 zurückreflektiert wird, wodurch vermieden wird, daß sich die Beleuchtungsquelle 1 zu sehr aufheizt.

15 Das Graufilter 3 selbst dient zur Abschwächung der Beleuchtungsstrahlung und ist vorteilhafterweise auf einer Schwenkeinrichtung angeordnet, die es ermöglicht, das Graufilter 3 nach Bedarf in den Beleuchtungsstrahlengang ein- bzw. aus diesem herauszuschwenken. Die Schwenkeinrichtung ist zeichnerisch nicht dargestellt.

20 Optional kann auch vorgesehen sein, mehrere Graufilter 3, die aufgrund unterschiedlicher Transparenz in der Lage sind, das Beleuchtungslicht mehr oder weniger abzuschwächen, auf einem Wechselrad anzuordnen, so daß es möglich ist, wahlweise je nach gewünschter Abschwächung eines dieser Filter in den Beleuchtungsstrahlengang zu stellen. Die Wechseleinrichtung ist zeichnerisch nicht dargestellt, bezüglich ihrer
25 Bauweise jedoch aus dem Stand der Technik bekannt.

Die Homogenisierungseinrichtung 5 ist in dem Ausführungsbeispiel nach Fig.1 als innen total-reflektierender, transparenter Vollglasstab mit rechteckigem Querschnitt ausgeführt.

30 Die Homogenisierungseinrichtung 5 weist eine Einstrahlfläche 8 und eine Abstrahlfläche 9 auf. Das durch die Einstrahlfläche 8 in die Homogenisierungseinrichtung 5 eintretende Licht wird auf dem Weg durch die Homogenisierungseinrichtung 5 vielfach nach innen total-reflektiert, was zu einer Durchmischung einzelner Strahlungsanteile
35 führt und zum Ergebnis hat, daß das Beleuchtungslicht an der Abstrahlfläche 9 mit weitestgehend gleichmäßig verteilter Intensität austritt.

Anstelle des Vollstabes kann auch ein innenverspiegelter Hohlstab vorgesehen sein, wobei statt der Totalreflexion normale Reflexion an den verspiegelten Innenflächen auftritt.

5

Die erste optische Baugruppe 4 hat die Aufgabe, das von der Beleuchtungsquelle 1 kommende Licht möglichst verlustfrei auf die Einstrahlfläche 8 zu fokussieren. Die zweite optische Baugruppe 6 dient dazu, die homogen leuchtende Abstrahlfläche 9 in die Feldblendenebene 10 der Mikroskopanordnung abzubilden.

10

In der Feldblendenebene 10 befindet sich eine Feldblende 11, die mit Hilfe von transparenten und intransparenten Flächenabschnitten eine Ausleuchtung des Objektfeldes mit hohem Kontrast ermöglicht. Unmittelbar vor der Feldblende 11 ist ein Shutter 12 angeordnet, der dazu dient, je nach Ansteuerung ausgewählte Teilbereiche der Feldblende 11 zu verdunkeln. Hierdurch wird die Überstrahlung des Autofokussensors 32 mit zu viel von der Probe 20 reflektiertem Anregungslicht vermieden.

15

Die Ansteuerung des Shutters 12 erfolgt über einen Rotationsmotor 13, der es ermöglicht, unterschiedliche Shutter-Einstellungen in den Beleuchtungsstrahlengang einzubringen, wodurch die Überstrahlung des Autofokussensors 32 mit zu viel von der Probe 20 reflektiertem Anregungslicht effektiv verhindert werden kann.

20

Der Feldblende 11 ist ein teiltransparenter Umlenkspiegel 14 nachgeordnet, durch den ein überwiegender Strahlungsanteil 2.1 des Beleuchtungsstrahlengangs in Richtung auf einen Beleuchtungstubus 15 gelenkt wird. Ein geringerer Strahlungsanteil 2.2 des Beleuchtungsstrahlengangs tritt durch den teiltransparenten Umlenkspiegel 15 hindurch und trifft auf einen Monitordetektor 16, der zur Kontrolle der Intensität des Beleuchtungslichts dient.

25

Der Monitordetektor 16 kann mit einer Anzeigeeinrichtung für die Strahlungsintensität und/oder über eine Auswerteschaltung mit einer Nachstelleinrichtung zur Veränderung der Strahlungsintensität verbunden sein, wobei die Strahlungsintensität des von der Beleuchtungsquelle 1 ausgehenden Lichts beispielsweise über die Betriebsspannung beeinflusst werden kann. Die Rückkopplung des Signalausgangs des Monitordetektors 16 zur Beleuchtungsquelle 1 ist zeichnerisch nicht dargestellt, kann jedoch in einer aus der Regelungstechnik bekannten Weise vorgenommen werden.

30

35

Beim Durchtritt durch den Beleuchtungstubus 15 wird der Strahlungsanteil 2.1 parallelisiert und trifft dann auf einen nachgeordneten Filterwürfel 17. Der Filterwürfel 17 ist eintrittsseitig mit einem ersten Spektralfilter 18 versehen, das dafür sorgt, daß nur
5 Beleuchtungslicht mit Wellenlängen zum Strahlteiler 19 des Filterwürfels 17 gelangt, die zur Anregung einer Probe 20 vorgesehen sind.

Das ausgewählte Anregungslicht wird von dem Strahlteiler 19, der bevorzugt als teildurchlässige Platte ausgebildet ist, in Richtung auf die Probe 20 umgelenkt, tritt dabei
10 durch ein Objektiv 21 hindurch und wird durch dieses auf die Probe 20 fokussiert.

Die Probe 20 wird zur Fluoreszenz angeregt. Das von der Probe 20 kommende Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv 21 gesammelt und tritt nach Passieren des Objektivs 21 durch den Strahlteiler 19 des Filterwürfels 17 hindurch.

15 Die in Richtung auf eine Kamera 22 weisende Austrittsfläche des Filterwürfels 17 ist mit einem zweiten Spektralfilter 23 versehen, welches nur das von der Probe 20 kommende Fluoreszenzlicht hindurchläßt. Zwischen dem Filterwürfel 17 und der Kamera 22 ist ein Abbildungstubus 24 vorhanden, der die Probenoberfläche auf eine ortsauflösende Empfangsfläche in der Kamera 22 abbildet. Üblicherweise ist der Kamera 22 eine
20 Blende 25 vorgeordnet.

Das hier gewählte Ausführungsbeispiel wird für die Fluoreszenzmikroskopie beschrieben. Deshalb ist der Filterwürfel 17 hinsichtlich seiner Gesamtfunktion als Farbteiler
25 ausgeführt. Wird mindestens eines der Spektralfilter 18 bzw. 23 entfernt und der Strahlteiler 19 als nicht-dichroitischer Teiler ausgeführt, so ist diese Mikroskopanordnung auch zur Abbildung und Vermessung reflektierender Proben geeignet.

Die Probe 20 ist auf einem Probentisch 38 positioniert, der in den Koordinatenrichtungen X und Y senkrecht zur optischen Achse des Objektivs 21 verstellbar ist. Dabei ist
30 die optische Achse des Objektivs 21 senkrecht zur Schwerkraftichtung ausgerichtet, während die Koordinatenrichtung Y parallel zur Schwerkraftichtung ausgerichtet ist.

Mit dieser Mikroskopanordnung sind die Voraussetzungen für hochgenaue Messungen insbesondere an Biochips geschaffen, da der zu untersuchende Probenabschnitt weitestgehend homogen ausgeleuchtet wird.
35

Die Homogenität des Beleuchtungslichts wird erfindungsgemäß noch weiter verbessert, wenn beispielsweise die Einstrahlfläche 8 und/oder die Abstrahlfläche 9 der Homogenisierungseinrichtung 5, wie weiter oben bereits dargelegt, mit einer Struktur aus Mikrolinsen versehen sind.

Die Ausführung der Homogenisierungseinrichtung 5 als innen total-reflektierender transparenter Vollglasstab oder als innen verspiegelter Hohlstab, wie in Fig.1 dargestellt, ist beispielhaft gewählt. In einer anderen Ausführungsform, wie in Fig.2 gezeigt, kann die Homogenisierungseinrichtung 5 auch flexibel als Glasfaserbündel 26 ausgeführt sein.

Auch in diesem Fall können dem Glasfaserbündel 26 eine Einstrahlfläche 8 und eine Abstrahlfläche 9 zugeordnet und diese ebenfalls wie oben dargestellt mit Mikrolinsen strukturiert sein.

Zusätzlich oder auch anstelle der Abstrahlfläche 9 kann eine Lichtstreu Scheibe (zeichnerisch nicht dargestellt) vorhanden sein, wodurch die Homogenisierung der Strahlungsintensität weiter beeinflußt wird.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Fig.1 und Fig.2 für jeweils dieselben Baugruppen auch dieselben Bezugszeichen verwendet worden.

Dies trifft auch für die Fig.3 zu, die im wesentlichen den Aufbau der Mikroskopanordnung wie in Fig.1 und Fig.2 zeigt, jedoch mit dem Unterschied, daß hier die Homogenisierungseinrichtung 5 aus zwei optischen Elementen 27 und 28 gebildet ist, die beide an ihrer der Beleuchtungsquelle 1 zugewandten Lichteintrittsfläche eine Struktur aus Mikrozyylinderlinsen aufweisen. Dabei sind die Mikrozyylinderlinsen mit ihrer Längsrichtung in beiden Fällen senkrecht zur optischen Achse 2 des Beleuchtungsstrahlengangs ausgerichtet, wobei allerdings die Längsrichtung der Mikrozyylinderlinsen auf dem optischen Element 27 zur Längsrichtung der Mikrozyylinderlinsen auf dem optischen Element 28 um 90° verdreht sind.

Auch hierdurch wird, wie bereits weiter oben beschrieben, eine Homogenisierung der Intensität des Beleuchtungslichts erzielt und damit die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst.

Aus Fig.1, Fig.2 und Fig.3 geht weiterhin hervor, daß die erfindungsgemäße Mikroskopanordnung mit einer Autofokussiereinrichtung ausgestattet ist, die im wesentlichen einen Autofokuslaser 29, eine Glasplatte 30 zur Einkopplung der vom Autofokuslaser 29 ausgehenden Laserstrahlung 31 in den Beleuchtungsstrahlengang, eine Autofokusaktorik, die weiter unten anhand Fig.5 näher erläutert wird, sowie einen Autofokussensor 32 umfaßt.

Anhand Fig.4 soll zunächst das Funktionsprinzip der Autofokussiereinrichtung näher erläutert werden. Wie aus Fig.4 ersichtlich ist, befindet sich zwischen dem Filterwürfel 17 und dem Objektiv 21 die Glasplatte 30, von welcher der zur Fokussierung genutzte Laserstrahl 31 durch das Objektiv 21 hindurch auf die Probe 20 gelenkt wird. Die Glasplatte 30 ist vorzugsweise auf der dem Autofokuslaser 29 abgewandten Seite entspiegelt. Der Glasweg der Glasplatte 30 wird im Gesamt-Optik-Design rechnerisch berücksichtigt.

Die Laserstrahlung 31 wird von der Oberfläche der Probe 20 reflektiert, tritt in entgegengesetzter Richtung wieder durch das Objektiv 21 hindurch, passiert die Glasplatte 30 und wird an dem Strahlteiler 19 des Filterwürfels 17 in Richtung auf den Beleuchtungstubus 15 umgelenkt, tritt durch den Beleuchtungstubus 15 und den teiltransparenten Umlenkspiegel 14 hindurch und trifft danach auf den Autofokussensor 32, dem üblicherweise eine Blende 33 vorgeordnet ist.

Der Laserstrahl 31 besitzt eine Wellenlänge, die von dem Strahlteiler 19 des Filterwürfels 17 zumindest überwiegend reflektiert wird. Der teiltransparente Umlenkspiegel 14 ist für die Wellenlänge des Laserstrahls 31 hinreichend transparent, so daß ein ausreichender Strahlungsanteil zum Autofokussensor 32 gelangt. Der Autofokussensor 32 beinhaltet beispielsweise eine ortsauflösende Empfangsfläche (Position Sensitive Detector), eine Vier-Quadranten-Fotodiode, eine CCD-Empfangszeile oder einen flächigen CCD-Empfänger.

Wird das Objektiv 21 in der dargestellten Richtung R verschoben, so ändert sich auf der Empfangsfläche des Autofokussensors 32 die räumliche Verteilung der von der Probenoberfläche reflektierten Laserstrahlung. Dies ist ein Kriterium für die aktuelle Fokusposition der Probe 20 relativ zum Objektiv 21.

Zum Zweck der Verschiebung in Richtung R ist das Objektiv 21 mit einer parallel zur optischen Achse 2 des Beleuchtungsstrahlengangs ausgerichteten Geradföhrung 34 verbunden, die einen positionsgenau ansteuerbaren Antrieb 37 aufweist (vgl. Fig.5). Dabei ist der Signaleingang des Antriebes über eine Auswerte- und Ansteeereinrichtung (ebenso wie der Antrieb nicht zeichnerisch dargestellt) mit dem Signalausgang des Autofokussensors 32 verbunden. Ein zu diesem Zweck zu schaffender Regelkreis ist aus dem Gebiet der Regelungstechnik hinreichend bekannt und muß demzufolge hier nicht näher erläutert werden.

- 10 Der Vollständigkeit halber sei darauf hingewiesen, daß zur Autofokussierung anstelle des eingekoppelten Laserstrahls 31 prinzipiell auch die Beleuchtungsstrahlung zur Bestimmung der Fokusslage genutzt werden kann.

In Fig.5 ist das Prinzip der Autofokusaktorik dargestellt. Diese dient dazu, das Objektiv 15 21 in Abhängigkeit von einem Stellbefehl in Richtung R der optischen Achse 2 des Beleuchtungsstrahlengangs zu verschieben und dabei den Abstand zwischen der Probe 20 und dem Objektiv 21 zu verändern, um den Fokuspunkt des Objektivs 21 in die gewünschte Lage relativ zur Probe 20 zu bringen. Die Geradföhrung 34 ist in Fig.5 symbolisch dargestellt.

20 Das Objektiv 21 ist dabei mit einem beweglichen Teil der Geradföhrung 34 fest verbunden. Über eine Wippe 35, die um ein Drehgelenk 36 schwenkbar ist, ist das Objektiv 21 mit einem Antrieb 37, hier beispielsweise als Linearantrieb ausgebildet, verbunden. Als Linearantriebe sind geeignete Antriebsmechanismen einsetzbar, wie beispielsweise motorisierte Spindelantriebe, Piezo-Aktuatoren, Magnetkern-/Magnetspul- 25 Stelleinrichtungen u.ä.

Wie bereits weiter oben beschrieben, ist der Signalausgang des Autofokussensors 32 in Fig.4 mit einer zeichnerisch nicht dargestellten Auswerte- und Steuereinheit verbunden, die in Abhängigkeit von der aktuell ermittelten Fokusslage einen Steuerbefehl für den Antrieb 37 generiert. Damit bewirkt das Zusammenspiel von Autofokussensor 32 und Antrieb 37 eine automatisierte Einstellung der optimalen Fokusslage, so daß sich die Probe 20 exakt in der Objektebene befindet und scharf auf die Empfangsfläche der Kamera 22 abgebildet wird.

In Fig.6 ist eine besonders im Hinblick auf die Autofokussierung vorteilhafte Ausgestaltungsvariante der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung dargestellt. Die Zeichnung deutet an, daß die Flächennormale des Spektralfilters 18 nicht parallel zur optischen Achse des Beleuchtungstubus 15 ausgerichtet ist, sondern mit dieser optischen Achse
5 einen Winkel α von beispielsweise 5° einschließt.

Damit wird erreicht, daß das an der Eintrittsfläche reflektierte Beleuchtungslicht nicht zum Autofokussensor 32 gelangt, so daß eine Übersteuerung des Autofokussensors 32 durch dieses in Bezug auf die Autofokussierung Falschlicht vermieden wird.

10

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung, die zeichnerisch nicht dargestellt ist, ist das erste Spektralfilter 18 auf einer Halterung angeordnet, welche die Änderung der Neigung seiner Flächennormalen und damit die Beeinflussung des am ersten Spektralfilter 18 reflektierten Lichts ermöglicht. Beim Betreiben der Mikroskopanordnung werden die Neigungsrichtung und der Winkel α dann so eingestellt, daß störende Reflexe
15 den Autofokussensor 32 minimal belasten und so eine optimale Ermittlung der aktuellen Fokusposition möglich ist.

Wie in Fig.7 dargestellt kann in ähnlicher Weise vorgesehen sein, daß auch die Flächennormale des zweiten Spektralfilters 23 mit der optischen Achse 42 des Abbildungsstrahlengangs einen Winkel einschließt, der im Bereich von 1° bis 20°, vorzugsweise bei 5° liegt. Der Zweck der Neigung des zweiten Spektralfilters 23 besteht darin zu verhindern, daß der von der Empfangsfläche in der Kamera 22 reflektierte Anteil des Abbildungslichts wieder zum zweiten Spektralfilter 23 und von dort wiederum zurückgeworfen nochmals zur Empfangsfläche gelangt, wodurch Sekundärbilder bzw.
25 Fehlabbildungen entstehen könnten.

Dabei kann wie bereits anhand des ersten Spektralfilters 18 in Fig.6 erläutert, das zweite Spektralfilter 23 auf einer Kippeinrichtung angeordnet sein, welche die Verstellung des Neigungswinkels und der Neigungsrichtung ermöglicht, so daß auch hier
30 während des Betriebes der Mikroskopeinrichtung eine Einstellung des Neigungswinkels gefunden werden kann, bei der störende Reflexe das Empfangssignal der Kamera 22 gar nicht oder nur minimal verfälschen.

Die erfindungsgemäße Mikroskopanordnung zeichnet sich weiterhin durch eine besonders vorteilhafte Antriebseinrichtung aus, mit welcher der Probentisch 38 gekoppelt ist. Dies ist in Fig.8 symbolisch dargestellt.

- 5 In Fig.8a befindet sich beispielsweise neben dem Objektiv 21, dessen optische Achse senkrecht zur Schwerkraftrichtung ausgerichtet ist, der Probentisch 38, der in den Koordinatenrichtungen X und Y senkrecht zur optischen Achse des Objektivs 21 verstellbar ist. Dabei stimmt die Koordinatenrichtung Y mit der Schwerkraftrichtung überein.
- 10 Fig.8b zeigt einen Blick in Richtung A (vgl. Fig.8a), d.h. in Richtung der optischen Achse auf die Probe 20, die beispielsweise in einem nicht dargestellten Probenträger aufgenommen sein kann.

- In Fig.8b sind die Verstellrichtungen in den Koordinaten Y und X eingezeichnet, in denen mittels einer Stelleinrichtung eine definierte Positionsänderung des Probentisches 38 und somit der Probe 20 senkrecht zur optischen Achse des Objektivs 21 erfolgt.
- 15

- Dabei hat sich bewährt, daß die Verstelleinrichtung einen Spindelantrieb zur Positionsänderung des Probentisches 38 in der Koordinatenrichtung Y und einen Piezoantrieb zur Positionsänderung des Probentisches 38 in der Koordinatenrichtung X aufweist. Der Spindelantrieb ist vorteilhaft mit einem Schrittmotor gekoppelt, der ebenso wie der Piezoantrieb eine definierte elektronische Ansteuerung ermöglicht.
- 20

- Da die Verstellung in der Koordinate Y in Richtung der Schwerkraft erfolgt, muß die auf den Probentisch 38 wirkende Schwerkraft kompensiert werden, wozu ein Spindelantrieb vorteilhaft geeignet ist. Dagegen ermöglicht der für die Verstellung in der Koordinate X gewählte Piezoantrieb eine verhältnismäßig schnelle Linearbewegung, die im gewählten Ausführungsbeispiel auch der Tatsache entgegenkommt, daß die Probe in X-Richtung eine größere Ausdehnung aufweist als in Y-Richtung. Lineare Piezoantriebe, die auf der Basis piezokeramischer Schwingstäbe arbeiten, sind aus der Technik bekannt und müssen deshalb hier nicht näher erläutert werden.
- 25
- 30

- Der Spindelantrieb und der Piezoantrieb werden so angesteuert, daß die Verschiebung in den Richtungen X und Y in Schritten erfolgt, die der Größe des Objektfeldes des Objektivs 21 entsprechen. Auf diese Weise wird eine Vielzahl von Einzelaufnahmen der Probenoberfläche gewonnen, die in einer Auswerteelektronik gespeichert und zu einem
- 35

Gesamtbild zusammengesetzt werden, was auch sukzessive nach jeder Einzelaufnahme vorgenommen werden kann.

5 Anhand Fig.9 ist dargestellt, wie eine kartuschenartige Probe 20, die ein Reservoir für eine Flüssigkeit 39 aufweist, mit der erfindungsgemäßen Mikroskopanordnung vermessen werden kann. Dabei befinden sich an der Glas/Flüssigkeits-Grenzfläche zu untersuchende fluoreszierende Substanzen, z.B. fluoreszenzmarkierte DNA oder Proteine. Der Fokuspunkt des Objektivs 21 wird mit Hilfe der Autofokussiereinrichtung exakt auf diese Grenzfläche eingestellt.

10

Aufgrund der horizontalen, d.h. senkrecht zur Schwerkraftrichtung ausgerichteten optischen Achse des Objektivs 21 können sich Luftblasen, die sich häufig an Glas/Flüssigkeits-Grenzflächen bilden, am Ort 40 oberhalb des Flüssigkeitspegels sammeln.

15

Da kartuschenartige Proben 20 oftmals aus unpräzise hergestellten Kunststoffteilen bestehen, ist erfindungsgemäß eine Nivellier Vorrichtung 41 vorgesehen, die es gestattet, die Glas/Flüssigkeits-Grenzfläche exakt senkrecht zur optischen Achse des Objektivs 21 auszurichten, indem die Probenoberfläche gegen die Auflagefläche des Proben-

20 tisches 38 verkippt wird und damit die Flächennormale der zu untersuchenden Grenzfläche an der Probe 20 parallel zur optischen Achse des Objektiv 21 ausgerichtet wird.

25

Die Erfindung ist in besonderem Maße für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen geeignet, sie kann, wie bereits dargelegt, ohne weiteres aber auch für reflektive Oberflächenuntersuchungen verwendet werden.

Patentansprüche

- 5 1. Mikroskopanordnung, umfassend
- eine Beleuchtungsquelle (1), optische Baugruppen zur Erzeugung eines Beleuchtungsstrahlengangs und ein Objektiv (21), durch das der Beleuchtungsstrahlengang auf eine Probe (20) gerichtet ist, die sich in der Objektebene des Objektivs (21) oder in deren Nähe befindet, sowie
 - 10 – optische Baugruppen zur Erzeugung eines auf die Empfangsfläche einer Kamera (22) gerichteten Abbildungsstrahlengangs, dadurch gekennzeichnet, daß eine Homogenisierungseinrichtung (5) zur Vergleichmäßigung der Intensität des Beleuchtungslichts, das auf den zu untersuchenden Probenabschnitt trifft, vorhanden ist.
- 15 2. Mikroskopanordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Homogenisierungseinrichtung (5) als Lichtleiter ausgebildet ist mit einer der Beleuchtungsquelle (1) zugewandten Einstrahlfläche (8) und einer dem Objektiv (21) zugewandten Abstrahlfläche (9) für das Beleuchtungslicht.
- 20 3. Mikroskopanordnung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Lichtleiter als innen verspiegelter Hohlstab, als innen total-reflektierender, transparenter Vollstab, als Flüssigkeitslichtleiter oder in Form eines Glasfaserbündels (26) ausgeführt ist.
- 25 4. Mikroskopanordnung nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der optisch wirksame Querschnitt des Lichtleiters kreisrund, quadratisch oder rechteckig ausgeführt ist.
- 30 5. Mikroskopanordnung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Ein- und/oder die Abstrahlfläche (8,9) der Homogenisierungseinrichtung (5) mit einer Mikrolinsenstruktur versehen ist, wobei eine Vielzahl runder, quadratischer, wabenförmiger oder zylinderförmiger Mikrolinsen mit jeweils einem Linienradius von etwa 100 µm bis 1000 µm nebeneinander angeordnet sind.
- 35 6. Mikroskopanordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

- als Homogenisierungseinrichtung (5) zwei im Beleuchtungsstrahlengang aufeinander folgende, mit Mikrozylinderlinsen strukturierte optische Bauelemente (27,28) vorgesehen sind, wobei
 - die Längsrichtung der Mikrozylinderlinsen auf beiden Bauelementen (27,28) senkrecht zur optischen Achse (2) des Beleuchtungsstrahlengangs ausgerichtet sind, und wobei
 - die Längsrichtung der Mikrozylinderlinsen auf dem einen Bauelement (27) mit der Längsrichtung der Mikrozylinderlinsen auf dem anderen Bauelement (28) einen Winkel von 90° einschließt.
7. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Mittel zur Abbildung der Abstrahlfläche (9) in die Feldblende (10) der Mikroskopanordnung sowie Mittel zur Abbildung der Feldblende (10) in die Objektebene vorhanden sind.
8. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die optisch wirksame Fläche einer in der Feldblende (10) angeordneten Feldblende (11) streifenartig oder schachbrettartig strukturiert ist, wobei in der Struktur transparente und intransparente Teilflächen alternieren.
9. Mikroskopanordnung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Feldblende (11) ein ansteuerbarer Shutter (12) vorgeordnet ist, der zur Verdunklung auswählbarer Flächenbereiche der Feldblende (11) dient.
10. Mikroskopanordnung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß
- der Feldblende (11) im Beleuchtungsstrahlengang ein teildurchlässiger Umlenkspiegel (14) nachgeordnet ist,
 - von dem der überwiegende Teil des Beleuchtungslichts durch einen der Parallelisierung des Beleuchtungslichts dienenden Beleuchtungstubus (15) und
 - durch ein erstes Spektralfilter (18) zur Auswahl eines zur Anregung vorgesehenen Anteils des Beleuchtungslichts hindurch
 - auf einen Farbteiler, bevorzugt einen dichroitischen Spiegel, oder einen teiltransparenten Spiegel trifft und
 - von dessen Teilerfläche (19) durch das Objektiv (21) hindurch auf die Probe (20) gelenkt wird.

11. Mikroskopanordnung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß
- das von der Probe (20) emittierte Fluoreszenzlicht zurück durch das Objektiv (21) tritt,
 - die Teilerfläche (19) des Farbteilers oder teiltransparenten Spiegels passiert und
 - 5 - nachfolgend durch ein zweites Spektralfilter (23), das für das Emissionslicht durchlässig ist, und durch
 - einen Abbildungstubus (24) hindurch zu der Kamera (22) gelangt.
12. Mikroskopanordnung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß
- 10 der Beleuchtungstubus (15) und der Abbildungstubus (24) aus identischen optischen Baugruppen ausgeführt sind.
13. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß dem Objektiv (21) ein abnehmbares Ausgleichsglas vorgeordnet
- 15 ist, wodurch wahlweise mit Ausgleichsglas auf einer dem Objektiv (21) zugewandten Luft/Festkörper-Grenzfläche der Probe (20) oder ohne Ausgleichsglas durch einen transparenten Probenträger hindurch gemessen werden kann.
14. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein durch den teiltransparenten Umlenkspiegel (14) hindurchtretender Anteil des Beleuchtungslichts auf einen Monitordetektor (16) gerichtet
- 20 ist, der zur Kontrolle der Intensität des Beleuchtungslichts dient.
15. Mikroskopanordnung nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Flächennormalen der Spektralfilter (18,23) mit der optischen
- 25 Achse (2) des Beleuchtungsstrahlengangs bzw. mit der optischen Achse (42) des Abbildungsstrahlengangs einen Winkel im Bereich von 1° bis 20°, vorzugsweise von 5°, einschließen.
- 30 16. Mikroskopanordnung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Spektralfilter (18) im Beleuchtungsstrahlengang und das Spektralfilter (23) im Abbildungsstrahlengang gemeinsam mit dem Farbteiler bzw. dem teildurchlässigen Spiegel als Filterwürfel (17) ausgebildet sind.
- 35 17. Mikroskopanordnung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Filterwürfel (17) mit mindestens einem weiteren Filterwürfel, der sich von dem er-

sten Filterwürfel (17) hinsichtlich seiner Auslegung für die Anregungs- und Emissionswellenlängen des Beleuchtungslichts unterscheidet, auf einer Wechseleinrichtung, bevorzugt einem Wechselrad angeordnet ist.

- 5 18. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in den Beleuchtungsstrahlengang ein gegen dessen optische Achse (2) geneigtes Graufilter (3) einschwenkbar ist, wobei die Flächennormale auf die Lichteintrittsfläche (7) des Graufilters (3) mit der optischen Achse (2) des Beleuchtungsstrahlengangs einen Winkel im Bereich von 5° bis 15° einschließt.
- 10 19. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Beleuchtungsquelle (1) über eine lösbare mechanische Verbindung mit den übrigen Baugruppen der Mikroskopanordnung verbunden ist.
- 15 20. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Objektiv (21) auf einer Geradföhrung (34) parallel zu seiner optischen Achse verschiebbar anordnet und zu diesem Zweck mit einer motorisch angetriebenen Stelleinrichtung gekoppelt ist.
- 20 21. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Objektiv (21) mit mindestens einem weiteren Objektiv, das sich bezüglich seiner optischen Eigenschaften vom ersten Objektiv (21) unterscheidet, auf einer Wechseleinrichtung, bevorzugt einem Objektivrevolver, befindet.
- 25 22. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß
- eine Autofokussiereinrichtung vorgesehen ist, die einen Autofokuslaser (29), einen Autofokussensor (32) und eine Autofokusaktorik umfaßt, sowie
 - Mittel zur Einkopplung eines Laserstrahls (31) für die Autofokussiereinrichtung in den Beleuchtungsstrahlengang vorhanden sind.
- 30 23. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Kamera (22) eine CCD- oder CMOS-Kamera vorgesehen ist.
- 35

24. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die optische Achse des Objektivs (21) senkrecht zur Schwerkrafttrichtung ausgerichtet ist.
- 5 25. Mikroskopanordnung nach einem der vorgenannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufnahme der Probe (20) ein in den Koordinatenrichtungen X und/oder Y senkrecht zur optischen Achse des Objektivs (21) verstellbarer Probentisch (38) vorgesehen ist, wobei die Koordinatenrichtung Y parallel zur Schwerkrafttrichtung verläuft.
- 10 26. Mikroskopanordnung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Probentisch (38) mit einem Piezoantrieb und/oder mit einem Spindeltrieb gekoppelt ist, wobei bevorzugt zur Verstellung in Koordinatenrichtung X der Piezoantrieb und in der Koordinatenrichtung Y der Spindeltrieb vorgesehen sind.
- 15 27. Mikroskopanordnung nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Probentisch (38) mit einer Nivelliereinrichtung (41) zur Einstellung der Neigung der Probenoberfläche relativ zur optischen Achse des Objektivs (21) gekoppelt ist.
- 20 28. Mikroskopanordnung nach einem der Ansprüche 25 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe (20) mittels eines Probenhalters auf dem Probentisch (38) angeordnet ist, wobei Probenhalter und Probentisch (38) lösbar miteinander verbunden sind.

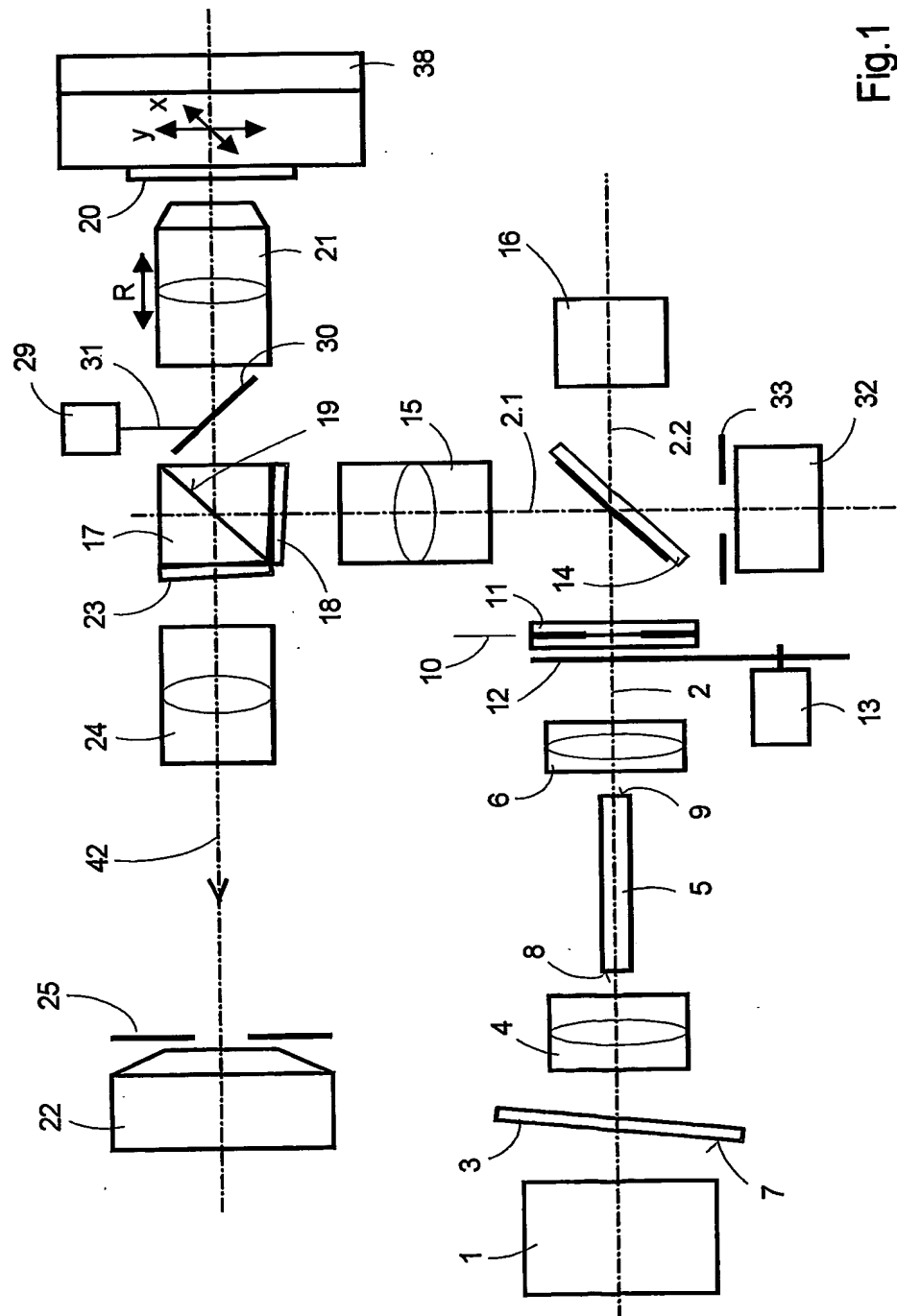


Fig.1

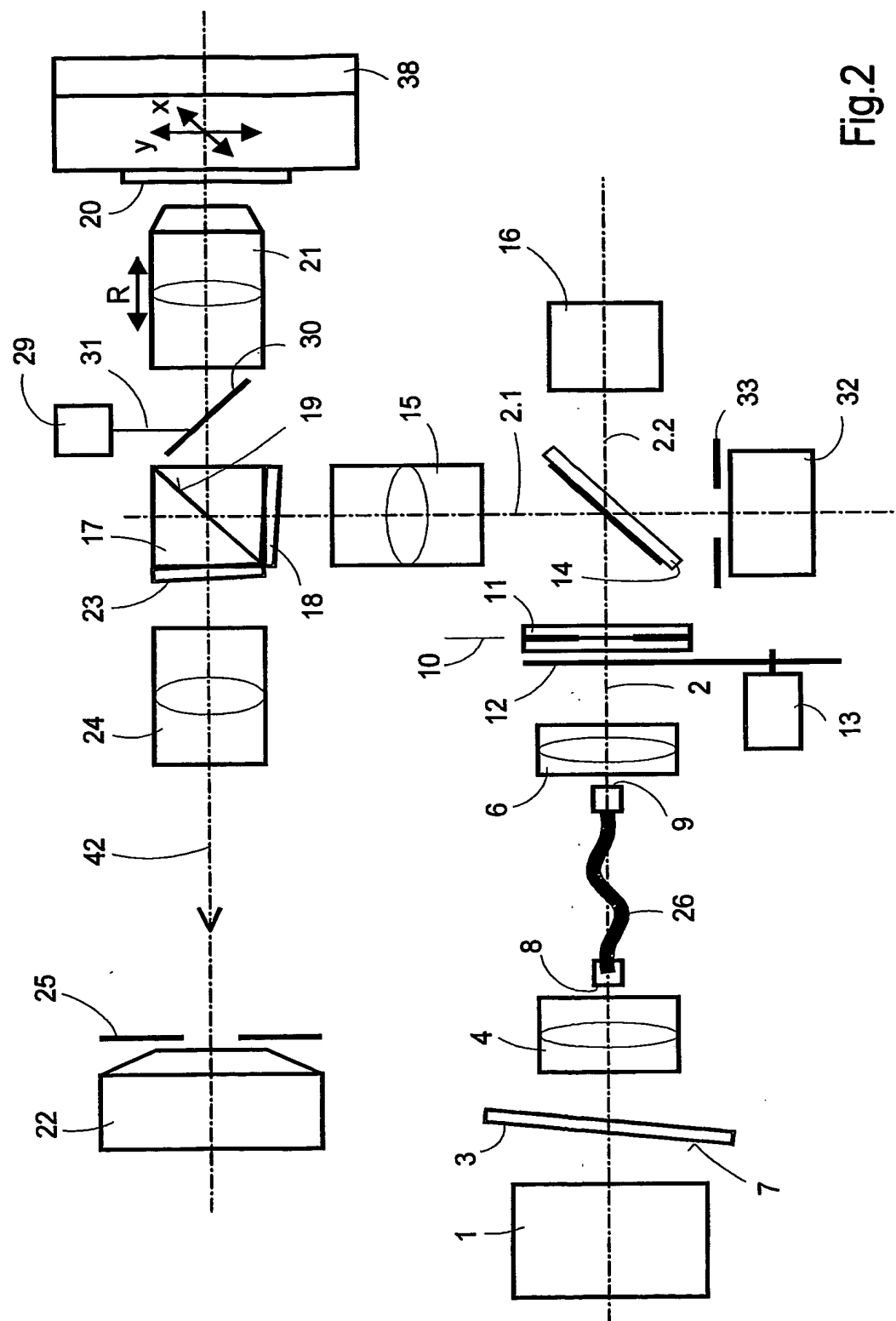


Fig.2

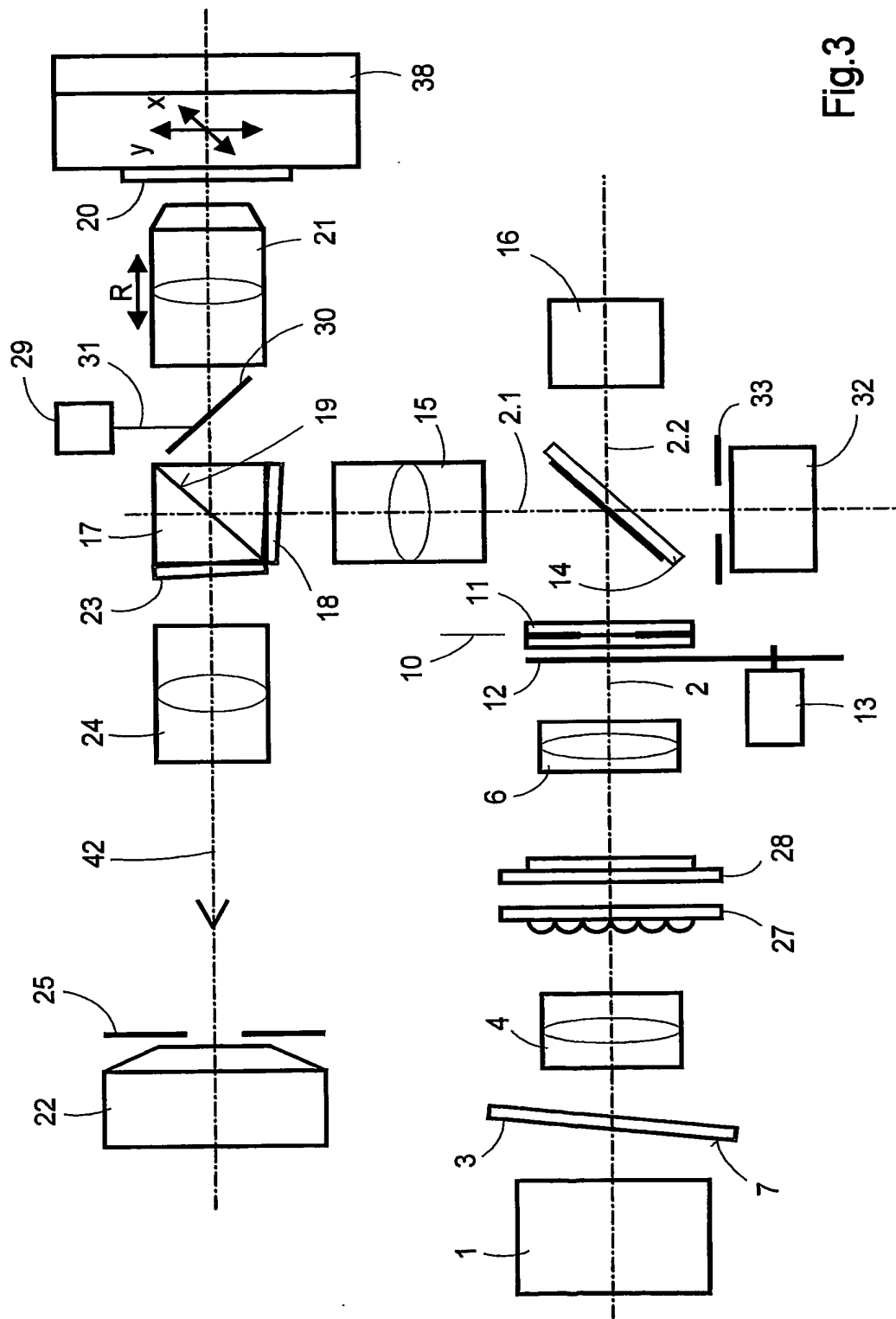


Fig.3

4/9

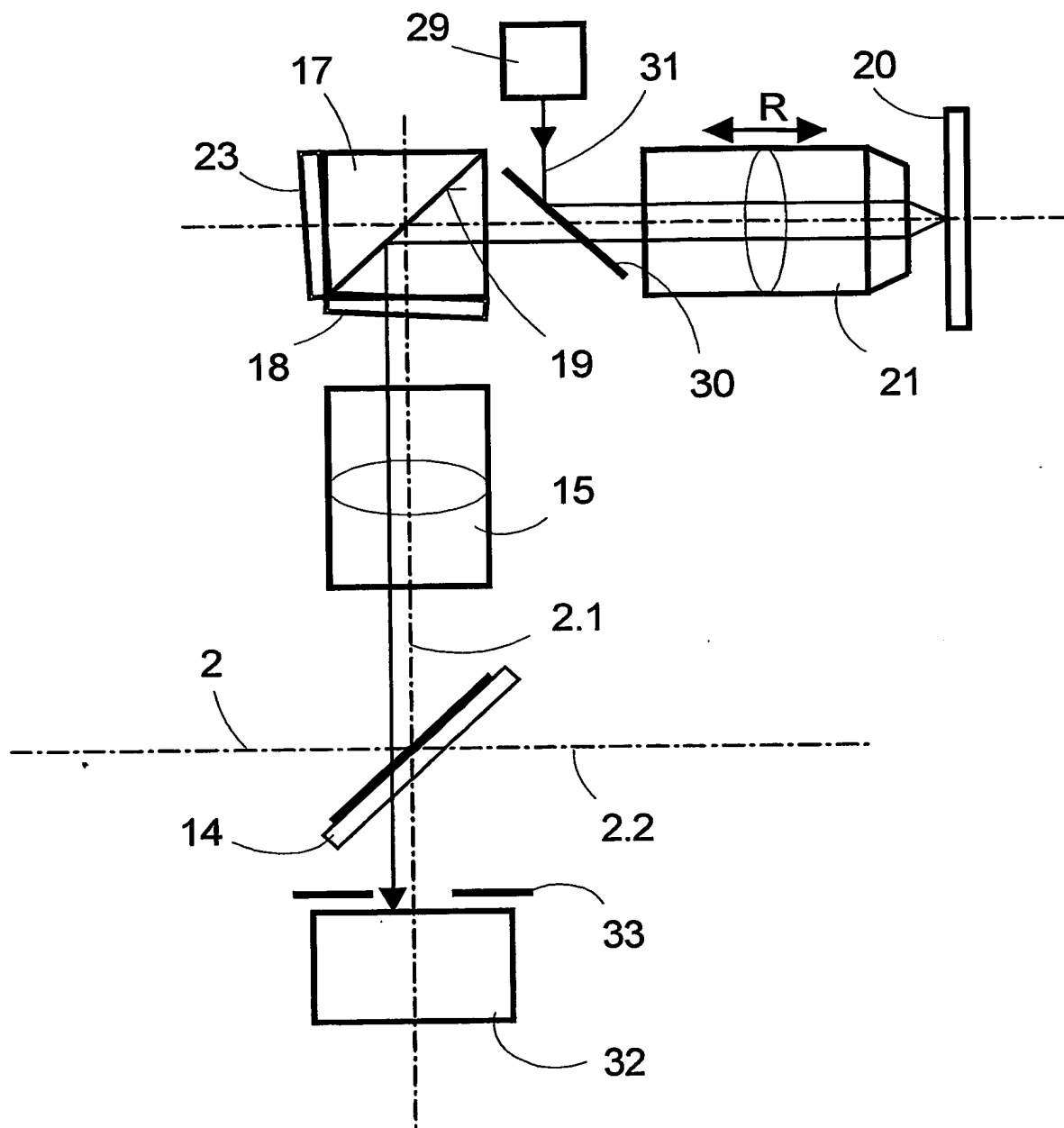


Fig.4

5/9

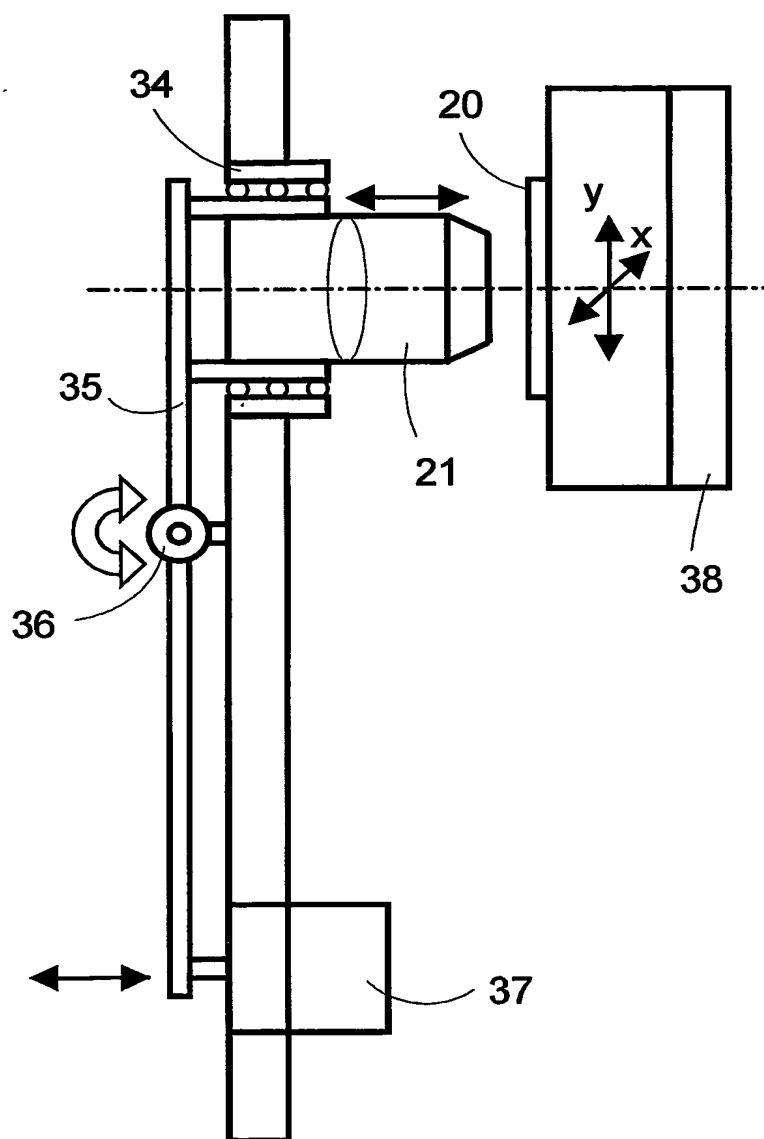


Fig.5

6/9

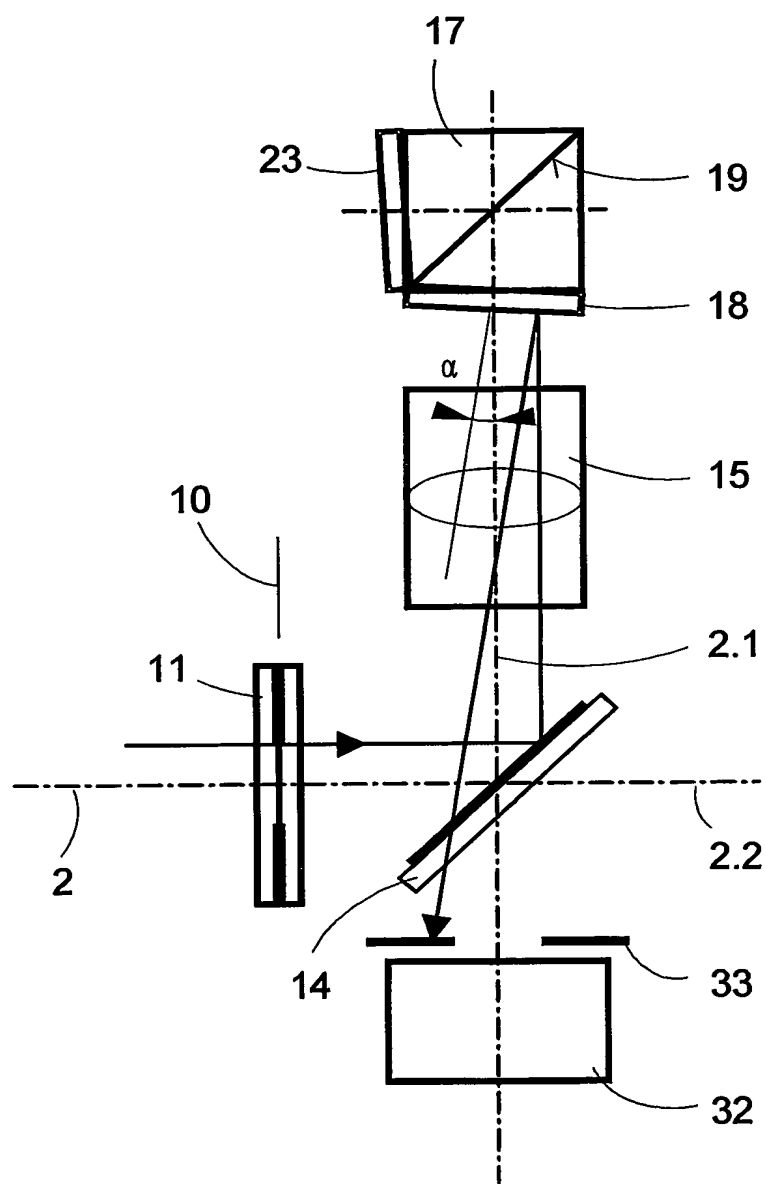


Fig.6

7/9

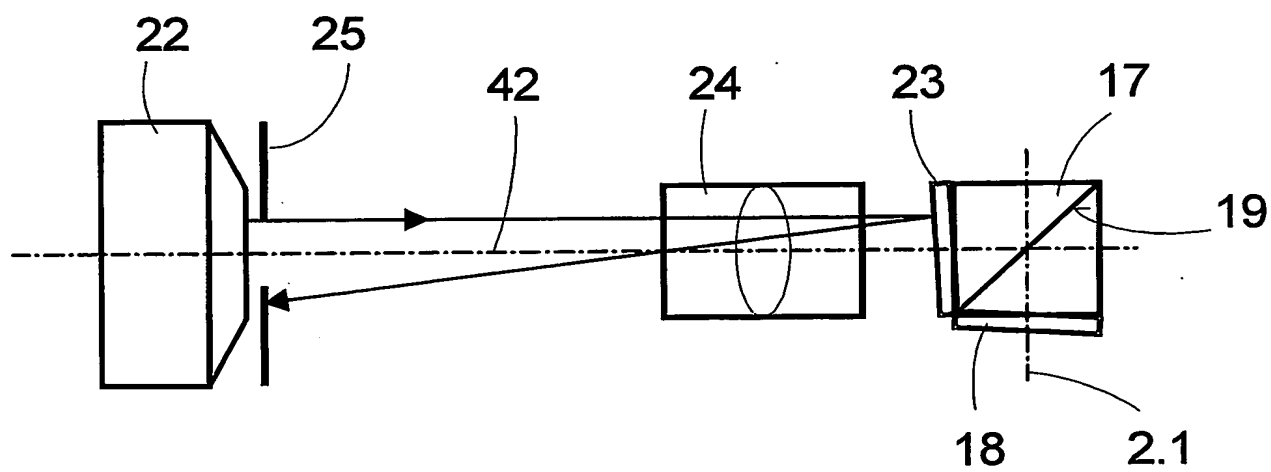


Fig.7

8/9

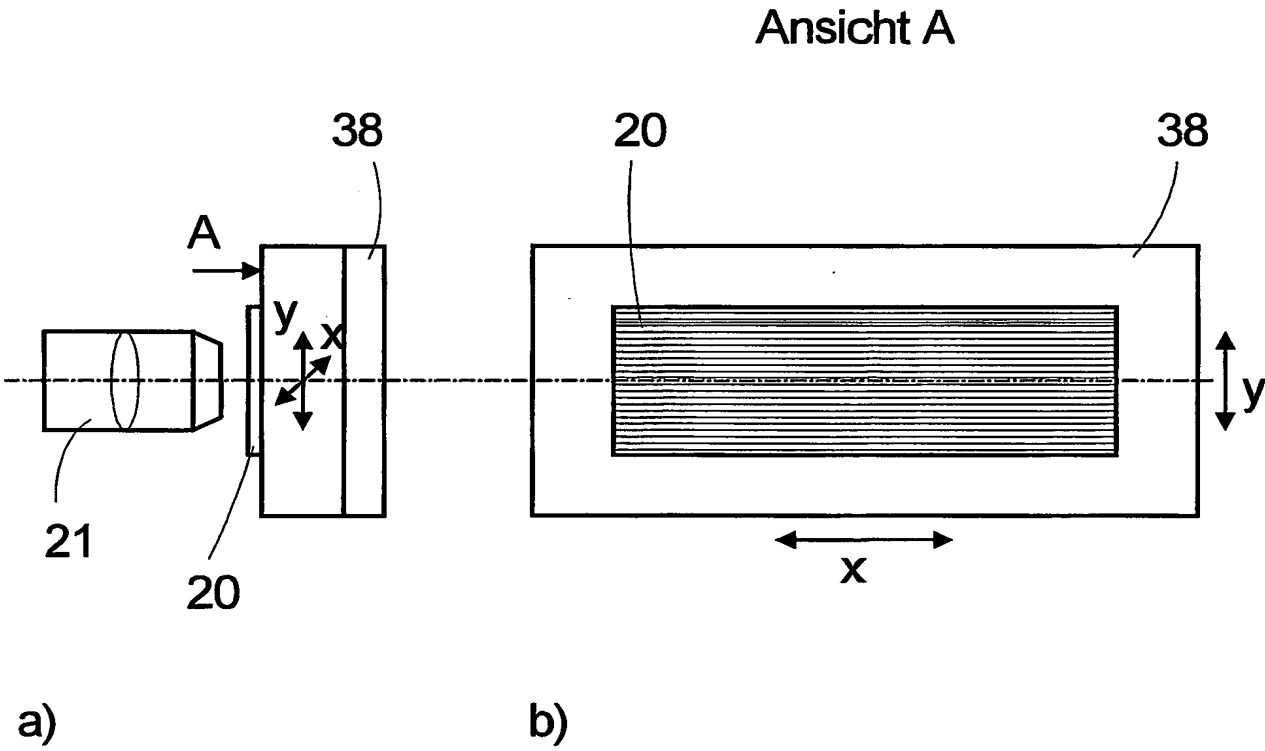


Fig.8

9/9

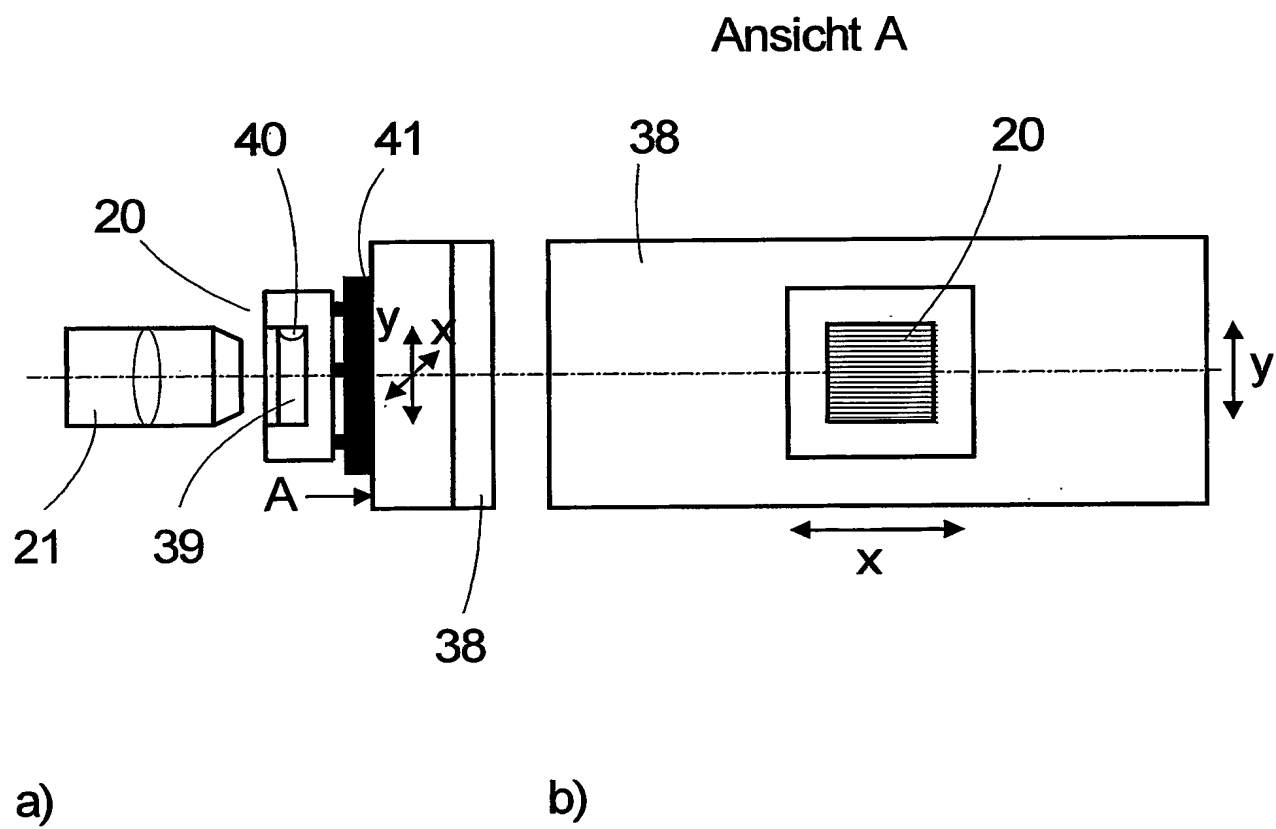


Fig.9